疫病菌引起之馬拉巴栗苗木腐敗

陳麗鈴[1] 安寶貞[2,5] 蘇俊峯[2] 王姻婷[2] 楊正偉[2] 蔡幸君[3] 蔡志濃[2] 林筑蘋[2] 謝廷芳[4]

1. 國立屏東科技大學植物醫學系。屏東內埔。
2. 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組。台中霧峰。
3. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局台中分局嘉義檢疫站。嘉義市。
4. 行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心。雲林古坑。
5. 通訊作者，電子郵件信箱：pjann5039@gmail.com；傳真：04-23302308。

接受日期：中華民國 103 年 9 月 20 日

摘　要

陳麗鈴、安寶貞、蘇俊峯、王姻婷、楊正偉、蔡幸君、蔡志濃、林筑蘋、謝廷芳。2014。疫病菌引起之馬拉巴栗苗木腐敗。植病會刊 23: 237-245。

馬拉巴栗苗木是我國重要之外銷觀葉植物，主產區在彰化溪洲一帶。近年來，田間栽培的馬拉巴栗苗木經常發生腐敗情形，造成苗木死亡、失編及出口貨品腐敗。本試驗發現疫病菌為引起馬拉巴栗苗木腐敗的重要病原菌之一，它可以感染馬拉巴栗全株，無論在苗期、編苗時期或本田期均可發生，愈年幼的苗木發病愈嚴重。幼苗染病時，葉片、新梢及莖部會出現水浸狀不規則淡褐色病斑，繼之病斑擴展，導致葉片褐化與落葉、新梢與莖部枯萎，甚至造成植株死亡。本田期的病徵主要出現在葉片與根系，造成葉片褐斑與細根腐敗。疫病在苗編時期亦會發生，主要造成根部水浸狀腐敗，苗木失編。田間調查結果顯示約有 30%以上的苗圃罹患疫病，本試驗自 47 處田區、編苗場及集貨場分離得疫病菌。分離得到的疫病菌主要有兩種，包括 *Phytophthora palmivora* 與 *Phytophthora nicotianae*（= *P. parasitica*），大部分為 A^1 配對型，極少部分為 A^2 配對型。兩種疫病菌在 12-34℃均可生長。此外，接種試驗結果顯示，*P. palmivora* 引起的疫病在 16-32℃均會發病，最適合發病的溫度為 28℃。疫病在多雨期發病嚴重，春天播種的苗木在梅雨季節與夏秋季播種的苗木於颱風季節均容易得病。病害的初次感染源可來自連作田受污染的土壤或鄰近的馬拉巴栗田區，環境合適時，病害一發不可收拾，嚴重時，田間發病率可高達 50-75%以上。*P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 引起的馬拉巴栗疫病為國內首度正式報導。

關鍵詞：馬拉巴栗、疫病、*Phytophthora palmivora*、*Phytophthora nicotianae*。

前　言

馬拉巴栗〔Malabar chestnut, *Pachira macrocarpa*（Cham. et Schl.）Schl. et L. H. Bailey〕原產於中南美洲，屬木棉科馬拉巴栗屬，為常綠或半落葉喬木，亦為熱帶觀葉植物。它的果實可食用，樹幹亦可製成紙漿，但是其主要用途乃在於觀賞[16]。在台灣，馬拉巴栗是栽培最多的觀葉植物，總面積約 480 公頃，主要分布於彰化與屏東兩地，以彰化溪州栽培最多。馬拉巴栗苗木的生產流程共分 5 個環節，包括播種、育苗、編苗、定植及採後處理[19]。馬拉巴栗產業以外銷為導向，輸往中國大陸、日本、韓國、歐美各地，已經有多年歷史。外銷總產值每年約台幣 2 億元。但自 2009 年起，馬拉巴栗外銷貨品在出貨前發生嚴重根腐情形，篩選過後的苗木在到岸後腐敗率更高，尤其是白露前後（國曆 9 月上旬）的貨品，其根部腐敗率高達 60-70%以上。

在台灣，有關馬拉巴栗病害的研究報導甚少，「台灣植物病害名彙」內記載的馬拉巴栗病害包括褐根病〔*Phellinus noxius*（Corner）G. H. Cunningham 引起〕、根腐病〔*Phytophthora cinnamomi* Rands 或 *Phytophthora palmivora*（Butler）Butler 引起〕及疫病〔*Phytophthora citrophthora*（R. E. Smith & E. H. Smith）Lionian 引起〕[11]。在初步分離接種試驗中，發現有多種真菌與卵球菌（oomycetes）均可造成馬拉巴栗幼苗根腐與死亡，其中又以 *Phytophthora* spp.、*Pythium splendens* Braun 及 *Lasiodiplodia theobromae*（Pat.）Griff. & Maubl.較為頻繁[2,3,5]，尤其以疫病菌對幼苗的威脅最大，本研究主要報告疫病菌對馬拉巴栗苗木之危害與病原菌鑑定。

材料與方法

田間病害調查與病菌分離、保存

不定期前往馬拉巴栗主產區，包括彰化縣溪州鄉、二水鎮、田中鎮與雲林縣土庫鎮、虎尾鎮等地，調查不同栽培期的馬拉巴栗田間病害發生情形。病害調查時將部分罹病植株攜回實驗室，先以自來水洗淨植株表面，

再將葉片上病斑與健康區間之組織切成 7 mm × 7 mm 小塊，新稍、莖部及根系組織切成 10 mm 長小片段，以 0.5%（v/v）次氯酸鈉（NaClO）水溶液進行表面消毒 30 sec 或不進行表面消毒，經無菌水漂洗並以乾淨舒潔衛生紙吸乾組織表面的無菌水，將該消毒過的組織移置於含有 20 mL 的 PDA〔potato dextrose agar，馬鈴薯葡萄糖瓊脂；每公升培養基中含有 200 g 煮沸過、切碎、未去皮的馬鈴薯塊莖濾液、20 g glucose、2%（w/v）Bacto agar（Difco, Maryland, USA）〕平板（直徑 9 cm），以及分離疫病菌之 5% CVA（Clarified V-8 juice agar）半選擇性培養基[15]上。半選擇性培養基的製作為先配製 5% CVA〔5% (v/v) V-8 vegetable juice（Campbell, New Jersey, USA）與 0.2%（w/v）$CaCO_3$ 混合後，經 1,500 rpm 低速離心 5 min，取上層液，再加入 2% Bacto agar〕，於滅菌後加入 ampicillin 100 ppm、PCNB（penta-chloronitrobenzene）10 ppm 及 mycostatin 50 ppm。罹病組織於室溫（24-28 ℃）培養 1-3 天後即會有菌絲長出，切取菌絲尖端移置於 PDA 或 5% VA （5% V-8 juice agar；將 5% V-8 vegetable juice 與 0.02% $CaCO_3$ 混合後，加入 2% Bacto agar 後滅菌）純化培養 7-14 天（室溫）。分離出之疫病菌經單游走子分離後，再移置於 5% VA 上，在 24 ℃下無光照培養 3-5 天，切取前端菌絲塊（10 mm×5 mm×5 mm），保存於含無菌水之試管中[4]，置於 20-24℃下，供下列各項試驗用。此外，將取回之病根與土壤浸於無菌水中，以誘釣法[9]誘釣可能潛伏的卵球菌，並經純化後保存備用。

編苗期與儲運期之病害調查與病菌分離

不定期前往馬拉巴栗編辮場調查苗木失編情形，並記錄發病率（%）。同時採集罹病植株，攜回實驗室進行分離、純化及保存（方法同上述田間病害調查）。此外，調查集貨場外銷不同地區（中國大陸、日本、韓國、歐洲、中南美洲等）的馬拉巴栗苗木根腐與莖腐情形，並分離與保存分離獲得的病菌。

菌落形態觀察

將分離菌株 p211040、p211052 及 p210403（均分離自彰化溪州罹病之馬拉巴栗根部）於室溫（24-28 ℃）下培養於含有 5% CVA 與 PDA 的培養皿（直徑 9 cm）中 4-6 天。記錄菌落型態，並照相。

疫病菌之產孢

孢囊（sporangia）之產生：於 24℃下，先將供試菌株在 5% VA 培養基上培養 3 天，再移置光照定溫箱內（1000-2000 lux，24℃）1-4 天，每日於顯微鏡下檢查有無孢囊長出，以明瞭供試菌株在固態培養基上是否會產生孢囊；欲明瞭病菌在水中之產孢能力，將生長 3-5 天的菌落先端切成 5 mm × 5 mm × 3 mm 的菌絲塊，移置於含有 20 mL 無菌水、直徑 6 cm 的 Pyrex 玻璃培養皿（New York, USA）中，再經光照處理後鏡檢。量取孢囊大小（size）與進行接種試驗時，則依 Hwang *et al.*[12]研發的方法，讓供試菌株產生大量孢囊。孢囊長出後，在顯微鏡下觀察與測量其大小，每菌株測量 100 個孢囊。

游走子（zoospores）釋放（孢囊間接發芽）：供試菌株產生大量孢囊後，每皿加入 20 mL 無菌水，於 15 ℃靜置 30 min，再放回室溫 30 min，大部分成熟之孢囊均會間接發芽釋放游走子。將游走子懸浮液濃度調節成每 mL 含有約 10^4-10^5 游走子，供接種試驗用。

厚膜孢子（chlamydospores）之產生：將生長 3-5 天之供試菌株的菌落切成 5 mm × 5 mm × 3 mm 的菌絲塊，置於培養皿（直徑 9 cm）內，每皿 4-6 塊，再倒入 5% V-8 蔬菜汁（5% V-8 vegetable juice + 0.02% $CaCO_3$）約 20 mL，放置於 24 ℃無光照定溫箱內，約 3-7 天後觀察厚膜孢子的形成情形，並量取孢子大小，每菌株約 50 個孢子。

配對型的測定與卵孢子的產生

配對型（mating type）測定：供試菌株先在新鮮 5% VA 上培養 3-5 天，將先端的菌絲部份切成 2 mm × 2 mm × 2 mm 小塊，移入含有 10 mL 新配製 10% VA 之培養皿（直徑 6 cm）的中央，每皿放置單一菌株之菌絲塊 3-4 塊，在 24℃無光照培養 6-10 天，再在顯微鏡下鏡檢有無卵孢子（oospores）產生，以判斷供試菌株是否屬同絲型（homothallic）。如果單一菌株不會形成卵孢子，再依 Ann & Ko[1]開發的方法將供試菌株分別與標準菌株（*P. nicotianae*）p991（A^1）和 p731（A^2）對峙培養，測定供試菌株的配對型。可與 A^1 配對產生卵孢子者為 A^2 型；可與 A^2 配對形成卵孢子者為 A^1 型。

卵孢子形成：利用 Ko 氏發展之夾膜（nucleopore membrane）方法，測定供試菌株是否會產生卵孢子及所屬之 Sexuality type[13,14]。並觀察與測定有性器官的大小，每菌株測量 50 個。

菌絲生長與溫度之關係

供試菌株先在 5% VA 培養 3-5 天，將菌絲先端的部份切成 2 mm × 2 mm × 2 mm 小塊，移入含 5% CVA 之直徑 9 cm 培養皿的一端（約距邊緣 1 cm）。溫度分成 8、12、16、20、24、28、32、33、34、35、36℃等 12 個處理，自第二天開始每日測量菌絲的直線生長速率，至菌絲長滿培養皿或生長至第 10 天為止。每處理 2 皿，試驗重複一次。

病原性測定

接種源與供試植物：供試菌株包括 p210399（A^1）、p211001（A^1）、p211040（A^1）、p211051（A^1）、p211052（A^1）、p210403（A^1）、210404（A^1）、211053（A^1），共八菌株。供試接種植物包括自行播種萌芽一個月的馬

拉巴栗幼苗，苗木移植於含有滅菌土的塑膠盆中（直徑 9 cm、盆高 12 cm），每盆兩株苗木。

接種方法與病害調查：分為全株噴霧接種與根部浸根接種二種接種方式。(1) 全株噴霧接種：將幼苗以自來水沖洗乾淨後，再噴佈 70%酒精，等風乾後，全株再噴佈游走子懸浮液（每 mL 含有約 10^4-10^5 游走子），每盆 10 mL。接種完畢後，以塑膠袋（60 cm × 30 cm）覆蓋植株保濕 48 小時，置於溫室中（24-28℃）。每供試菌株接種兩盆幼苗，試驗重複一次。(2) 根部浸根接種：將幼苗根部的土壤輕輕去除後洗淨，浸於含有 200 mL 游走子懸浮液（每 mL 含有約 10^4-10^5 游走子）的 500 mL 玻璃燒杯中。玻璃燒杯放置於冰浴中保持游走子活性。24 小時後再將幼苗種回盆缽中，置於溫室內，觀察病害發生情形。每供試菌株接種兩盆幼苗，試驗亦重複一次。所有的對照處理均接種蒸餾水。接種植株發病後，將罹病組織切下，以 0.5% NaClO 溶液表面消毒後放置於分離疫病菌之半選擇性培養基[15]上分離病原菌，以確定馬拉巴栗植株發病是否為接種疫病所引起，完成柯霍氏法則（Koch's postulates）。

溫度對馬拉巴栗疫病發病之影響

將馬拉巴栗萌芽的幼苗移植於含有無菌土之塑膠盆（直徑 13 cm、盆高 16 cm）中，每盆 5 株幼苗，育苗 3 個月後備用。依前述接種試驗方法處理苗木後，將疫病菌 p211052 菌株的游走子懸浮液（每 mL 含有約 10^4-10^5 游走子）均勻噴灑於馬拉巴栗苗上，每盆 30 mL。接種後以塑膠袋套袋保濕後分別置於 16、20、24、28 及 32℃定溫箱中（每日光照 12 小時），套袋 48 小時後除去套袋，1 週後調查病斑數及發病面積。每溫度 2 盆，實驗重複一次，對照處理（24℃）接種無菌水。

核醣體內轉錄區間與部分 β-tubulin 基因的 DNA 定序

DNA 抽取：將 p211052 (A^1)及 p210403 (A^1)等 16 株供試菌株移植於含 5% VA 的培養皿內，於 24℃下培養 3-5 天後，切取菌落周圍的新鮮菌絲塊，大小約 3 mm × 3 mm × 2 mm，接種於覆蓋一層玻璃紙（cellophane membrane）的 5% VA 培養皿的中央，經 24℃下培養 5-7 天後，將玻璃紙上的菌絲刮下，以無菌水稍微沖洗，經冷凍乾燥後，保存於-20℃備用。將冷凍乾燥的疫病菌菌絲約 20 mg 置於研缽中，加入液態氮（liquid nitrogen）後磨成粉末。再依照廠商的操作步驟，利用 Genomic DNA Purification Kit（GeneMark Technology Co., Taichung, Taiwan）抽取疫病菌的 DNA。

聚合酶連鎖反應（PCR）與 DNA 定序（sequencing）：委託昕穎生物科技公司（Seeing Bioscience Company, Taipei, Taiwan）進行 PCR 反應與 DNA 定序。分析範圍包括核醣體內轉錄區間（ribosomal internal transcribed spacer）ITS1 與 ITS2、5.8S rDNA，及部份 18S rDNA 與 28S rDNA 之序列。以供試菌株之 genomic DNA 為模板（templates），利用通用引子對（universal primers）ITS5 與 ITS4[22]進行 PCR 增幅反應。而分析 β-tubulin 區間(658 bp)的部分基因序列時，則利用 Villa *et al.*[18]開發的引子對 BT5（5'-GTATCATGTGCACGTACTCGG-3'）與 BT6（5'-CAAGAAAGCCTTA CGACGGA-3'）進行 PCR。之後，將 PCR 反應後的 DNA 產物直接定序（direct sequencing）。定序 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區域時，使用的引子對包括 ITS5、ITS4、5.8S2-1（5'-TCGCACATCGATGAAGAACG-3'）及 5.8S2-2（5'-TACGGACACTGATACAGG CAT-3'）；而定序 β-tubulin 的部分基因序列時，使用的引子對為 BT5 與 BT6。

DNA 序列組合（Assembly）與 GenBank 資料庫搜尋：將定序所獲得的核酸序列利用 Vector NTI 軟體（v. 10.0; InforMax, California, USA）工具，分別經由組合（contingent）與修剪（trimming）後獲得完整序列，而多型部位（polymorphic portions）則依照 IUPAC ambiguity codes 予以標示。定序後的疫病菌 DNA 序列直接上載到 NCBI GenBank 資料庫(http:// www.ncbi.nlm.nih.gov)，利用 BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）軟體從資料庫尋找最相近的疫病菌種類與菌株，並將具代表性的疫病菌 DNA 序列登錄在 GenBank 資料庫（ITS accession number: KJ801810, KJ801811; b-tubulin accession number: KJ801812, KJ801813）。

疫病菌之鑑定

形態、生理特性比較：依據供試菌株之菌落形態、孢囊形態與大小、卵孢子形成條件、形態及大小、厚膜孢子形成與否與大小、溫度對菌絲生長的影響，再依疫病菌之分類文獻[17,20,21]，予以傳統分類鑑定。同時上 NCBI 網站，比對核醣體 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 與部份 β-tubulin 基因的 DNA 序列，尋找最相近的疫病菌與菌株。

結 果

馬拉巴栗疫病的田間、編苗場、集貨場病害調查

依據田間調查結果，馬拉巴栗疫病在適溫（20-28℃）多雨期發病嚴重。春天播種的苗木在梅雨季節與夏秋季播種的苗木在颱風季節都十分容易得病。嚴重時，罹病田發病率可高達 50-75%以上。在幼苗發病初期，葉片與新梢會出現水浸狀、不規則淡褐色病斑（圖 1），繼之病斑擴展，導致整片葉片褐化、乾枯與落葉，甚至造成植株死亡（圖 2）。成株期的病徵主要出現在葉片與細根，造成葉片褐斑脫落與細根腐敗。100-102 年共調查 74 處苗圃與栽培田，其中有 40 田區檢測到疫病菌（大部分為苗圃）。疫病偶而在苗木編辮時發生，主要造成根部水

浸狀腐敗與苗木失編（圖 3、4）。疫病菌在集貨場、貨櫃與海運等出口苗木上亦可被檢出（圖 5、6）。在調查的 40 批次編苗場與集貨場貨品時，共有 7 次檢出疫病菌。100-102 年共分離到 88 株疫病菌，其中 60 株為 *P. palmivora*（A^1 配對型 55 株、A^2 配對型 5 株）；另 28 株為 *P. nicotianae*（= *P. parasitica*），全部皆為 A^1 配對型。兩種疫病菌造成的病徵無法以肉眼區別。

疫病菌的形態與生長特性

以分離菌株 p211052 (A^1)與 p210403 (A^1)為代表描述馬拉巴栗疫病菌的形態特性。從彰化溪州分離的疫病菌 p211052 菌株之菌落形態：於室溫下（24-28℃），在

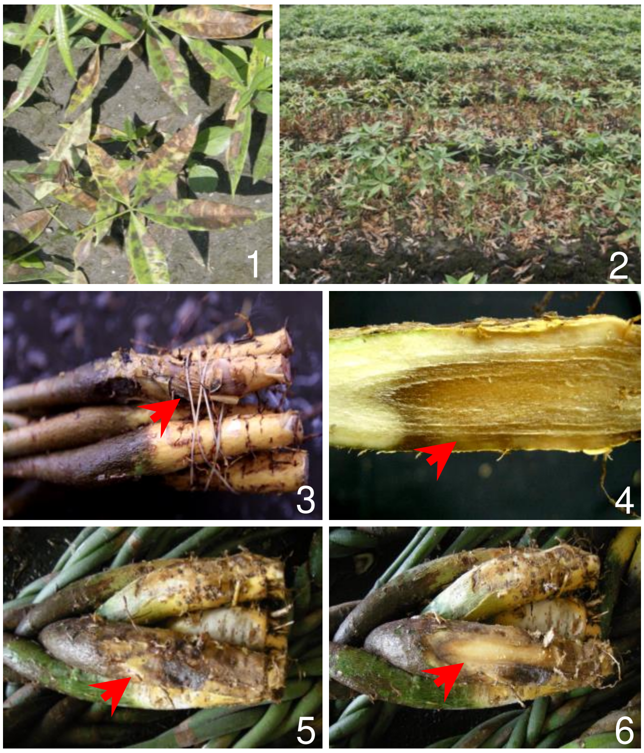

圖 1~6　馬拉巴栗苗木疫病之病徵。*Phytophthora* 危害馬拉巴栗幼苗，造成葉部褐斑腐敗（圖 1）與苗木大量落葉與死亡（圖 2）；*Phytophthora* 感染編苗根部，造成苗木失編（圖 3），染病根部出現水浸狀腐敗病徵（圖 4）；*Phytophthora* 感染出口貨品根部（圖 5），造成罹病根部嚴重水浸狀根腐（圖 6）

Figs. 1~6 Symptoms on Malabar chestnut caused by *Phytophthora* spp. Serious leaf blight of young seedlings (Fig.1) and premature defoliation and seedlings death (Fig. 2). Root infection of braided young seedlings resulting in the loss of braids (Fig. 3) with water-soaking rot symptoms (Fig. 4); infected export commodities (Fig. 5) inducing severe water soaking rot symptoms (Fig. 6).

5% CVA 上生長時略具放射狀，在 PDA 上則出現不明顯花紋，有少許氣生菌絲（圖 7）。該菌培養在 5% VA 上，於光照情形下，會形成少數孢囊，但將菌絲塊移置於無菌水中，以光照或礦物鹽液漂洗後[12]，則可形成大量孢囊。孢囊為單假軸（simple sympodium）方式著生，每一孢囊梗（sporangiophore）可著生 3-8 個孢囊（圖 8）。孢囊為橢圓形、卵圓形、橄欖形或檸檬形，兩側大致對稱，具顯著的半球型乳突（papilla）（圖 9）；孢囊具脫落性（deciduous），脫落率 100%，脫落的孢囊具有短孢囊柄（pedicels）（圖 9），長度 0.5-(0.8)-2.5 μm。供試菌株 p211052 的孢囊大小為 40-(52)-65×27.5-(33.8)-45 μm，孢囊長寬比（L/B）平均為 1.33-(1.55)-1.83。該菌株在黑暗狀態下可產生厚膜孢子，孢子大小 25-(32.7)-42.5μm。所有分離菌株中有 60 株與 p211052 形態相同，這些菌株在單獨培養時不會形成卵孢子，但其中 55 株菌株與 *P. nicotianae* A^2 菌株 P731 對峙培養後會產生卵孢子，因此該 55 菌株為 A^1 配對型；僅有 5 株菌與 P991 配對後會產生卵孢子，而該 5 株菌為 A^2 配對型。當利用夾膜法[13]，將 p211052 菌株與 A^2 配對型之標準菌株 P731 隔膜對峙培養後，p211052 與 P731 菌株均會自行產生卵孢子（selfing oospores），因此 p211052 菌株屬 sexuality type S^1（可刺激 A^2 菌株，及被 A^2 菌株刺激形成卵孢子）[14]。p211052 菌株之藏卵器（oogonia）表面平滑，卵孢子為非充實性，藏精器（antheridia）單生單室底著（圖 10）。經測量，藏卵器大小為 21.6-(25.5)-30.8 μm；卵孢子大小為 16-(20.4)-23.9 μm；藏精器大小為 7.9-(11.6)-15.3×10.1-(13.3)-17 μm。該菌菌絲可在 12-34℃生長，最適生長溫度為 28℃（圖 11）。

從彰化溪州分離的疫病菌 p210403（A^1）菌株在 5% CVA 與 PDA 上生長時，均會形成不明顯的嵌紋狀花紋，氣生菌絲稀少；但在 PDA 上生長時相對 5% CVA 較為緩慢（圖 12）。該菌在 5% VA 上偶而會形成少數孢囊；但將新鮮菌絲塊切下置於無菌水中光照時，形成的孢囊稍多，如以礦物鹽液漂洗處理後[12]，則可形成更大量的孢囊。孢囊以單假軸方式著生，每一孢囊梗可著生 3-5 個孢囊。孢囊為球形、橄欖形或檸檬形，兩側對稱或稍不對稱；孢囊具顯著半球型乳突（圖 13），有少數孢囊有 2 個乳突。孢囊不具脫落性。分離株 p210403 的孢囊大小為 45-(49.85)-55×35-(39.55)-45 μm，孢囊長寬比平均為 1.11-(1.27)-1.57。該菌可產生厚膜孢子，孢子大小 25-(36.95)-50 μm。分離菌株中有 28 株特性與 p210403 菌株相同，這些菌株在單獨培養時不產生卵孢子，但與 *P. nicotianae* A^2 菌株 P731 對峙培養後會形成卵孢子，因此均為 A^1 配對型。當利用夾膜法[13]，將該菌株與 P731A^2 隔薄膜對峙培養後，p210403 與 P731 (A^2)均會各自產生卵孢子。因此菌株 p210403 屬 sexuality type S^1[14]。p210403 菌株的藏卵器表面平滑，卵孢子為非充實性，藏精器單生單室底著（圖 14），疫病菌 p21043 菌株的藏

卵器大小為 22.3-(25.1)-29 µm；卵孢子大小為 18.1-(20.7)-24.1 µm；藏精器大小為 8-(11.8)-14.8×9.6-(13.2)-16.7 µm。該菌菌絲可在 8-36℃生長，最適生長溫度為 28℃（圖 11）。

馬拉巴栗疫病菌 *Phytophthora* 之傳統鑑定

經比對 Waterhouse 等人的分類文獻[17,20,21]及往日對疫病菌之鑑定經驗，由菌落形態、孢囊著生方式與形態、及有性繁殖器官等特徵，顯示自馬拉巴栗分離到的疫病菌有兩種，兩種菌均屬於 Waterhouse 分類群 group II，其中 p211052（A^1）為代表者鑑定為 *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler，其主要特性為孢囊單假軸著生，型態接近橢圓形、兩側對稱、乳突顯著、脫落性，孢囊長寬比平均大於或等於 1.4，會形成厚膜孢子，藏精器底著。另一代表 p210403（A^1）則鑑定為 *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan，其特性為菌落具嵌紋狀花紋、孢囊單假軸著生，孢囊接近球形、乳突顯著、不脫落，孢囊長寬比平均小於 1.4，會形成厚膜孢子，藏精器底著。

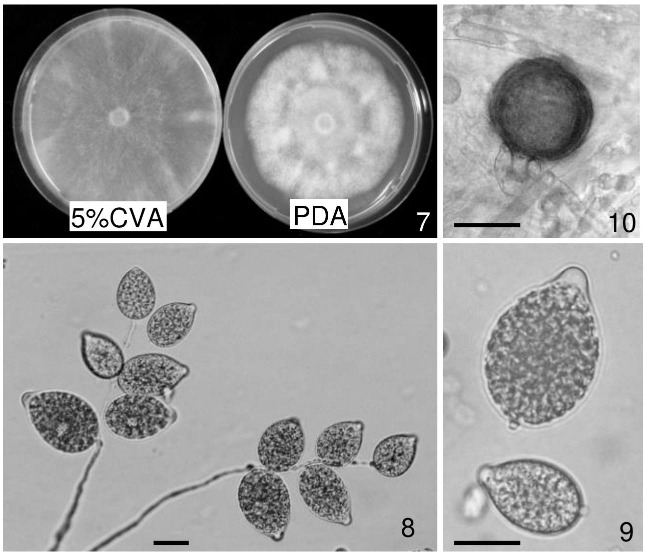

圖 7~10 危害馬拉巴栗之疫病菌 *Phytophthora palmivora*（菌株編號 p211052）之菌落與形態特徵。疫病菌於 24℃下在 5% CVA 與 PDA 上生長 5 天的菌落形態（圖 7）；孢囊（圖 8）、孢囊近照（圖 9）及卵孢子（圖 10）。Bar = 20 µm.

Figs. 7~10 Characteristics of colony and morphology of *Phytophthora palmivora* (isolate p211052) isolated from diseased Malabar chestnut. Colony morphology of culture grown on PDA (right plate) or 5% clarified V-8 juice agar (left plate) at 24℃ for 5 days (Fig.7); sporangia (Fig. 8 & 9) and an oospore with amphigenous antheridium (Fig. 10). Bar = 20 µm.

核醣體內轉錄區間 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 與部份 β-tubulin 基因的 DNA 定序

分析從台灣馬拉巴栗分離得到的 16 個疫病菌菌株〔其中 11 個菌株經形態鑑定為 *P. palmivora*，包含代表菌株 p211052（A^1）；另 5 個菌株為 *P. nicotianae*，包括代表菌株 p210403（A^1）〕，進行 ITS1-5.8S rDNA-ITS2（簡稱 ITS）與部分 β-tubulin 基因的 DNA 序列之定序與比對。經 ITS5、ITS4、5.8S2-1 及 5.8S2-2 為引子對定序、組合及整理後，結果以 p211052（A^1）為代表的 11 個疫病菌的 ITS 全長 DNA 序列均為 786 bp，所有菌株序列的相同度（identity）為 99.87-100%。利用 NCBI 網站的 BLAST 搜尋軟體，將 p211052（A^1）（accession no. KJ801810）的基因序列與 GenBank 收錄的 DNA 序列進行比對，所獲得最接近序列的疫病菌菌株為 *P. palmivora* CH89-37（accession no. AB769175）等 39 菌株，相同度為 100%。而以 p210403（A^1）（accession no. KJ801811）為代表的 5 株菌，依傳統分類鑑定為 *P. nicotianae* 的 ITS 序列則完全相同，經 NCBI 網站 BLAST 分析結果所獲得最接近序列的疫病菌菌株為 *P. nicotianae* AB205（HG007960）等 25 菌株，相似度亦為 100%。而利用 BT5 與 BT6 該組引子對分析該 16 株疫病菌菌株的部分 β-tubulin 基因序列，DNA 長度均為 658 bp。BLAST 搜尋結果顯示，代表菌株 *P. palmivora* p211052（A^1）與 *P. nicotianae* p210403（A^1）均與 GenBank 資訊庫中收錄最

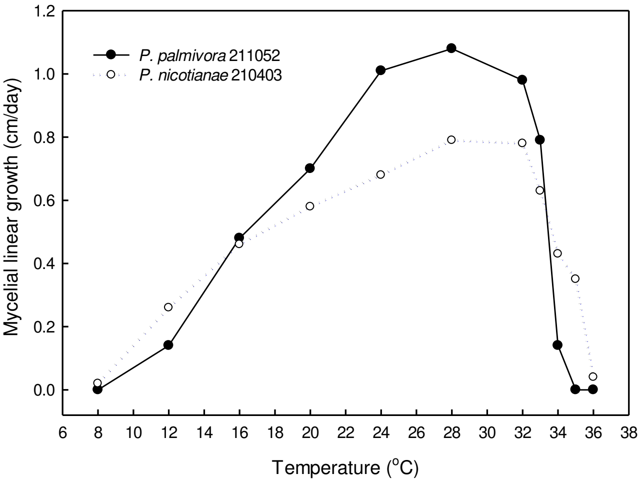

圖 11 兩種馬拉巴栗疫病菌菌絲在不同溫度下之直線生長情形。

Fig. 11 Effect of temperature on the linear mycelial growth of *Phytophthora palmivora* (isolate p211052) and *Phytophthora nicotianae* (isolate p210403) isolated from diseased Malabar chestnut. Cultures were grown on 5% clarified V-8 juice agar in Petri dishes for 5 days.

接近疫病菌菌株的部分 β-tubulin 基因的 DNA 序列相同度分別高達 98.67-99.85%與 100%。其中 p211052（A^1）（accession no. KJ801812）最相近的菌株為 *P. palmivora* PD_00032 (EU080465)；而 p210403（A^1）（accession no. KJ801813）最相近的菌株則為 *P. nicotianae* OVF（KF290379）。本試驗結果顯示 *P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 基因序列的比對結果與形態鑑定結果具一致性。

疫病菌之病原性測定

將供試疫病菌菌株 *P. palmivora* p210399（A^1）、p211001（A^1）、p211040（A^1）、p211051（A^1）、p211052（A^1）與 *P. nicotianae* p210403（A^1）、p210404（A^1）、p211053（A^1）以噴霧接種法接種萌芽 1 個月的馬拉巴栗幼苗時，於接種後第 3 天開始，所有的接種植株均出現病徵，葉片首先浮現水浸狀病斑，繼而病斑褐化、擴大、癒合，導致罹病植株大量黃化落葉。接種 5 天時，新梢與莖部亦開始發病，出現褐色病斑；到 2 星期時，已有多數植株萎凋、死亡，與田間病徵相同。接種實驗結果顯示，供試之 *P. palmivora* 菌株的致病性（virulence）均較 *P. nicotianae* 菌株為強，其中又以 *P. palmivora* p211052 菌株的致病性最強，所有接種的植株均在接種後 2 星期死亡。*P. nicotianae* 菌株的致病性相對較弱，雖然接種幼苗於接種後 3 天開始發病出現病斑，但病斑數相對較少，且僅侷限在葉部，在接種後 2 星期時每株病斑數平均在 5 個以下。所有接種發病的病斑，經分離鑑定，證實均為疫病菌引起，完成柯霍氏法則。浸根接種時，約 7-10 天後植株開始出現萎凋病徵，其中僅有 2 株（接種 *P. palmivora* p211052）在接種 2 星期時死亡，其餘植株均生長較對照處理為緩慢，且有落葉情形，在接種後 1 個月時，經分離接種根系，亦證實根部多處被疫病菌感染而引起壞疽腐敗。而對照處理於試驗期間並無葉片或根系腐敗情形發生，證實該 2 種疫病菌可以引起馬拉巴栗苗木病害，導致幼苗腐敗，甚而死亡。

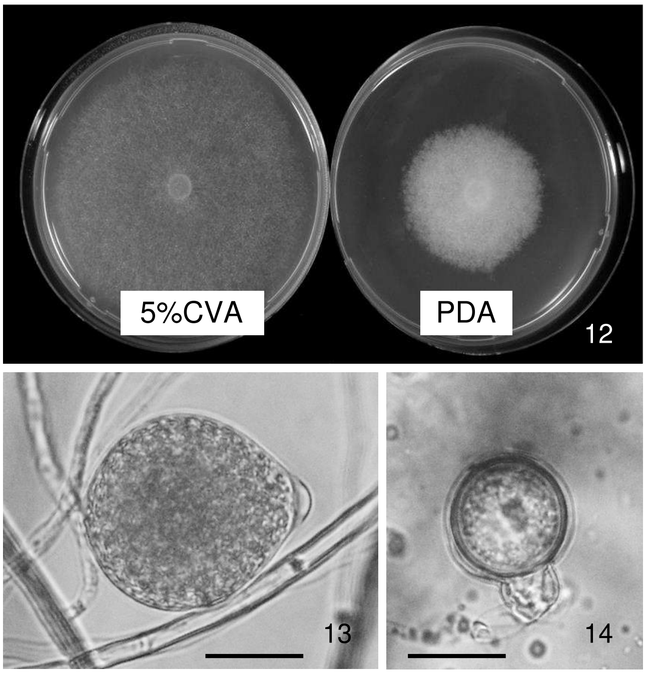

圖 12~14　危害馬拉巴栗疫病菌 *Phytophthora nicotianae*（菌株編號 p210403）的菌落與形態特徵。疫病菌於 24℃下在 5% CVA 與 PDA 上生長 5 天的菌落形態（圖 12）；孢囊（圖 13）與卵孢子（圖 14）。Bar = 20 µm.

Figs 12~14　Characteristics of colony and morphology of *Phytophthora nicotianae* (isolate p210403) isolated from diseased Malabar chestnut. Colony morphology of culture grown on PDA (right plate) or 5% clarified V-8 juice agar (left plate) at 24 ℃ for 5 days (Fig.12); sporangia (Fig. 13) and an oospore with amphigenous antheridium (Fig. 14). Bar = 20 µm.

溫度對馬拉巴栗疫病發病之影響

3 個月大的馬拉巴栗幼苗在接種疫病菌 *P. palmivora* p211052 菌株後，放置在不同溫度下，觀察病害發生情形，結果以 28℃病斑出現數目最多，每株平均出現 14.4 個病斑，其次依序為 24℃時 13.3 個病斑、20℃時 6.9 個病斑、32℃時 6 個病斑及 16℃時 5.9 個病斑；但以發病面積估算時，仍以 28℃發病最嚴重，發病面積約 50%；其次依序為 32℃發病面積約 20%、24℃發病面積約 10%、20℃與 16℃ 發病面積僅有約 1%。顯示高溫（28 與 32℃）有利病勢進展。

討　論

在台灣，外銷馬拉巴栗苗木的生產過程繁瑣且冗長，病害的發生常常是苗木生產的主要限制因子，經田間與集貨場調查，主要病害包括有苗木疫病（由 *P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 引起）、腐霉根腐病（由 *P. splendens* 引起）及苗編黑腐病（由 *L. theobromae* 引起）[2,3,5]。除此之外，經常可以分離到鐮孢菌 *Fusarium solani*，但都是伴隨上述病菌共同檢測而得到，或是在病勢進展停止後的病斑上分離得到。在正在進展的腐敗組織上則未能單獨檢測到鐮孢菌，推測其非造成植株根腐與編辮苗失編的主要因子，但可加重疫情（P. J. Ann, unpublished data）。

本文主要報告疫病菌危害馬拉巴栗的情形，有關腐霉菌及編辮時由黑腐菌引起的病害，將另文探討。疫病菌可危害馬拉巴栗全株，病害在苗期、編辮時期及本田期均可發生，但以幼苗期發病最為嚴重，愈年幼的苗木愈感病，尤其是降雨季節，狂風暴雨之後，經常可以造成苗圃全園廢耕。經土壤檢測，病害的初次感染源可來

自連作田受污染的土壤或相鄰的馬拉巴栗田區，環境合適時，病害一發不可收拾。實驗結果顯示，危害馬拉巴栗的疫病菌有兩種，包括 *P. palmivora* 與 *P. nicotianae*，這兩種疫病菌在台灣的寄主範圍都十分廣泛[10,11]，因此，危害馬拉巴栗的初次感染源也可能來自其他作物。依據作者的分離與目前統計資料，*P. nicoctianae* 的寄主範圍包括 93 屬（genus）、113 種（species）植物（P. J. Ann, unpublished data），它主要危害果樹、蔬菜及花卉[10,11]；而 *P. palmivora* 則危害 33 屬、46 種植物（P. J. Ann, unpublished data），主要的寄主亦為果樹與花卉[10,11]，對作物的經濟危害非常大。

Phytophthora palmivora 與 *P. nicotianae* 兩種疫病菌均屬 Waterhouse[20]分類系統中之 group II〔包括 Stamp *et al*[17]之分類系統〕，比較兩種疫病菌的孢囊、厚膜孢子與卵孢子形態，顯示兩者相似與重疊之處甚多。兩者的孢囊均具有半球形的明顯乳突，均會形成厚膜孢子；在有性繁殖方面，藏精器均為單生單室底著，且藏卵器、卵孢子及藏精器的大小亦相近。兩者的主要差異在於菌落形態，與孢囊的形態與脫落性，*P. nicotianae* 在 5% CVA 上生長時，會形成嵌紋狀花紋，而 *P. palmivora* 則為放射狀或無花紋；在孢囊方面，*P. palmivora* 具脫落性，脫落率 100%，脫落的孢囊具短梗，長度約 2 μm 左右，而且孢囊長寬比（L/B）較長，約 1.4 以上；而 *P. nicotianae* 的孢囊不具脫落性，孢囊的長寬比較短，約 1.2-1.4 之間。近年來開發分子分類方法，利用基因序列分析（DNA sequence analysis）作為分類鑑定的輔助依據，在 *Phytophthora* 方面，Cooke & Duncan[7]發現核醣體內轉錄區間的非轉錄區域（non-coding internal transcribed spacer regions）在種內（intra-species）具有相當的保守性（conservation）。而 Cooke *et al.*[8]也認為分析 ITS 區間的 DNA 序列可用為疫病菌的親源關係分析。此外，β-微管蛋白（β-tubulin）的基因序列亦可用於疫病菌種間的親緣關係（phylogenetic relationship）分析[18]。本試驗結果顯示，ITS 區域與部分 β-tubulin 基因的 DNA 序列可以有效輔助 *P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 兩種疫病菌之鑑定，兩種疫病菌的 DNA 序列與 NCBI GenBank 資料庫之疫病菌 *P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 的 DNA 相同度分別高達 98.67-100%與 100%。因而本試驗從馬拉巴栗分離的 *P. palmivora* 與 *P. nicotianae* 無論在傳統的形態特性分類上，或利用 ITS 區域與部份 β-tubulin 基因 DNA 序列的分子生物特性上，兩者的分類結果均非常一致。

綜合本研究的結果，得知生產無疫病污染的健康馬拉巴栗苗木的方法，首先在選擇育苗地點時，應找尋排水良好的新植地或是與水稻輪作後之田區播種育苗，切勿選擇連作田或緊鄰馬拉巴栗田區育苗，以避免病菌污染。育苗田須做高畦，作好排水設施；由於作物疫病的發生多在潮濕的降雨季節，因此勿在降雨季節播種、拔苗、定植及收穫，該期間發病與傳播機率較高。其次是選用適當藥劑來保護苗木、編辮苗及貨品[3,6]。

謝 辭

本文承蒙行政院農業委員會科技計畫〔101 農科-14.2.1-檢-B3(3)、102 農科-14.2.1-檢-B3(3)〕補助試驗經費，謹此誌謝。

引用文獻

1. Ann, P. J., and Ko, W. H. 1988. Hormonal heterothallism in *Phytophthora parasitica*: a novel mode of sexual reproduction? J. Gen. Microbiol. 134: 2985-299.
2. Ann, P. J., Su, J. F., Yang, C. W., Hsu, Z. H., Young, C. K., Tsay, H. C., and Chern, L. L. 2012. Seedling braiding disease of Malabar chestnut caused by *Lasiodiplodia theobromae* and management of root rot disease of this crop in the fields. Plant Pathol. Bull. 21: 150-151. (Abstract in Chinese)
3. Ann, P. J., Su, J. F., Yang, C. W., Lin, J. P., Tsay, H. C., and Chern, L. L. 2013. Seedling disease of Malabar chestnut caused by *Phytophthora* and *Pythium* and chemical control in greenhouse. Plant Pathol. Bull. 22: 169-170. (Abstract in Chinese)
4. Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 183-185.
5. Chen, J. W., Chern, L. L., Her, S. P., and Chen, L. Y. 2010. Study on stem rot of *Pachira macrocarpa*. Plant Pathol. Bull. 19: 291. (abstract in Chinese)
6. Chern, L. L., Ann, P. J., Su, J. F., Yang, C. W., Tsay, H. C., Tsai, J. N., and Hsieh, T. F. 2014. Screening of chemicals for control of seedling blight of Malabar chestnut in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 63:274-281. (in Chinese with English abstract)
7. Cooke, D. E. L. and Duncan, J. M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA repeat. Mycol. Res. 101: 667-677.
8. Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., and Brasier, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Gen. Biol. 30: 17-32.
9. Grimm, G. R., and Alexander, A. F. 1973. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. Phytopathology 63: 540-541.
10. Ho, H. H., Ann, P. J. and Chang, H. S. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. Acad. Sin. Mon. Ser. 15. Taipei, Taiwan, ROC. 86 pp.
11. Hsu, S. T., Chang, T. T., Chang, C. C., Tsai, J. L., and

Tsay, T. T. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan 4th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

12. Hwang, S. C., Ko, W. H., and Aragaki, M. 1975. A simplified method for sporangial production by *Phytophthora cinnamomi*. Mycologia 68: 1233-1234.
13. Ko, W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. J. Gen. Microbiol. 107: 15-18.
14. Ko, W. H. 1980. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora.* J. Gen. Microbiol. 116: 459-461.
15. Ko, W. H., Chang, H. S., and Su, H. J. 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71: 496-499.
16. Shen, R. S. 2005. Malabar chestnut. p.877-822. in Taiwan Agriculture Encyclopedia: Crop edition-2. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei. (in Chinese)
17. Stamp, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J., and Hall, G. S. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. Mycol. Pap. 162, Comm. Mycol. Ins. Kew Surrey, England.
18. Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., and Suga, H. 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β-tubulin gene sequences. Mycologia 98: 410-422.
19. Wang, T. S. 2010. Handbook of Postharvest Treatment for Malabar Chestnut. Chinese Pot Flower Development Association Pub. Taipei, 32 pp. (in Chinese)
20. Waterhouse, G. M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 92, CMI, Kew Surrey, England.
21. Waterhouse, G. M. 1970. The Genus *Phytophthora* de Bary-Diagnoses (or Descriptions) and Figures from the Original Papers. Mycol. Pap. 122. CMI, Kew Surrey, England.
22. White, T. J., Bruns, T., Lee, S.and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. Page 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M.A., Gelfand, D. H., Snirsky, J. J., and White, T. J., eds) Academic Press. San Diego, USA., 482 pp.

ABSTRACT

Chern, L. L.[1], Ann, P. J.[2,5], Su, J. F.[2], Wang I. T.[2], Yang, C. W.[2], Tsay, H. C.[3], Tsai, J. N.[2], Lin, J. P.[2] and Hsieh, T. F.[4]. 2014 Seedling Blight of Malabar Chestnut caused by *Phytophthora* Species in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23: 237-245. (1. Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology; Pingtung, Taiwan, ROC. 2. Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), COA; Taichung, Taiwan, ROC. 3. Animal and Plant Health Inspection and Quarantine Bureau, Taichung Branch, COA; Chiayi, Taiwan, ROC. 4. Floriculture Research Center, TARI, COA; Yunlin, Taiwan, ROC. 5. Corresponding author, e-mail: pjann5039@gmail.com; Fax: (04)23302803.)

Malabar chestnut (*Pachira macrocarpa* Schl. et L. H. Bailey) seedlings are important potted ornamental plants for export from Taiwan. The seedlings can be potted alone or braided in groups of three or five. The main production area of Malabar chestnut in Taiwan is Sijhou in Changhua County. In recent year, the production of Malabar chestnut has been impacted with diseases that cause root and basal rots of seedlings, leading to the death of seedlings in the field, loss of braids, and rots of plants in storage container during shipping. Our previous studies indicate that *Phytophthora* spp. are the major microorganisms that cause the disease. Results of this study showed that *Phytophthora* spp. were able to infect entire Malabar chestnut plant at any production stages, including seedling, braiding, and growth in the field. The plants were most susceptible at the seedling stage. Symptoms of infected seedlings included water-soaking, irregular-shaped brown lesions on leaves, shoots, and stems. In the field, the disease mainly affected leaves and roots, causing brown foliar lesions and root rot. At the seedling braiding stage, *Phytophthora* infection caused water-soaking lesions of roots and loss of braids. Our survey showed that more than 30% of the Malabar chestnut nurseries were affected by diseases caused by *Phytophthora* spp. Isolates of *Phytophthora* were obtained from 47 locations, including nurseries, cultivation fields, braiding houses, and packaging houses, and identified as *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora nicotianae* (= *P. parasitica*). Most of the isolates were A^1 mating type, and only a few were A^2. Both species could grow at temperature ranging from 12 to 34°C with an optimum growth at 28°C. Inoculation study showed that *P. palmivora* could cause disease at 16°C to 32°C with the optimum temperature at 28°C. *Phytophthora* diseases were more serious in wet seasons. Seedlings planted in spring and summer/autumn were most vulnerable due to rainy weather and typhoons. The primary inoculum could come from the infested soils of Malabar chestnut monocropping field and nearby cultivation fields. The *Phytophthora* diseases of Malabar chestnut were devastating when the environmental conditions were suitable for disease development, reaching infection rates of 50-70%. This is the first official record of *Phytophthora* diseases of Malabar chestnut caused by *P. palmivora* and *P. nicotianae* in Taiwan.

Key words: Phytophthora disease, Malabar chestnut, *Phytophthora palmivora, Phytophthora nicotianae*.